

⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑩ Offenlegungsschritt  
⑪ DE 3341367 A1

⑥ Int. Cl. 3:

G01N 33/54

C 07 G 7/00

401N 33/54 F

DE 3341367 A1

⑩ Aktenzeichen: P 33 41 367.3  
⑩ Anmeldetag: 15. 11. 83  
⑩ Offenlegungstag: 24. 5. 84

⑩ Unionspriorität: ⑩ ⑩ ⑩  
16.11.82 JP P200730-82

⑪ Anmelder:  
Taniguchi, Masaru, Chiba, JP

⑫ Vertreter:  
Wilhelms, R., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Kilian, H.,  
Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 8000 München

⑬ Erfinder:  
Taniguchi, Masaru; Wakabayashi, Seiji, Chiba, JP

⑩ Melanomdiagnosemittel mit Gehalt an monoklonem spezifischen Antikörper

Mittel zur Diagnose von Melanom bei Menschen, das einen monoklonen Antikörper wie M2590 Antikörper enthält, der geeignet ist, ein Säugetieren eigenes Melanomantigen anzuzeigen. Diagnoseausstattungen, bei denen das genannte Reagenz verwendet wird, sowie Immunoassays zum Auffinden von Melanomantigen.

DE 3341367 A1

3. Komponente einer Diagnoseausstattung zur Erkennung von menschlichem Melanom, die in Form einer Festkörperphase vorliegt, an der ein monokloner Antimelanomantikörper angeordnet ist, der fähig ist, ein Säugetieren eigenes  
5 Melanomantigen zu erkennen.

4. Komponente nach Anspruch 3, bei der die Festkörperphase einen Träger aufweist, an oder in dem ein Immunoassay ausgeführt werden kann.

10 5. Komponente nach Anspruch 3, wobei der monoklonale Antikörper M2590 Antikörper ist.

15 6. Komponente nach Anspruch 4, wobei der monoklonale Antikörper M2590 Antikörper ist.

7. Reagenz nach Anspruch 1, wobei der Markierungsanteil ein bei Immunoassays verwendeter Markierungsanteil ist.

20 8. Reagenz nach Anspruch 7, in dem der Markierungsanteil ein radioaktives Element ist.

9. Reagenz nach Anspruch 8, in dem der Markierungsanteil ein Enzym ist.

25 10. Diagnoseverfahren zur Auffindung der Anwesenheit von Melanom bei einem Menschen, wobei ein monokloner Antimelanomantikörper, der fähig ist, ein Säugetieren eigenes Melanomantigen zu erkennen, mit einem Extrakt von Gewebe oder Zellen des betreffenden Menschen, in denen Melanomzellen vermutet werden, ausbrütet und die Menge des genannten Antikörpers bestimmt wird, die mit in dem besagten Extrakt anwesenden Antigenen reagiert.

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Reagenz zur Verwendung für die Melanomdiagnose, wobei das Reagenz einen monoklonen Antimelanomantikörper enthält, der ein Säugetieren eigenes Melanomantigen erkennt. Die Erfindung betrifft 5 ebenfalls Diagnoseverfahren zur Auffindung von Melanomen (Melanomkarzinomen, -sarkomen), wobei das genannte Reagenz verwendet wird.

Erfindungsgemäß wurde auf einem T-Zellenspiegel (T cell level) die Existenz eines melanomspezifischen Antigens, das verschieden den Tierarten eigen ist, gefunden, das auf der Oberfläche von Melanomzellen ausgebildet ist (Nature, 294, 748-750, 1981).

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Diagnosereagenz zur Verfügung zu stellen, das einen 15 monoklonen Antimelanomantikörper enthält.

Aufgabe der Erfindung ist ebenfalls, einen monoklonen Antimelanomantikörper zur Verfügung zu stellen, der nicht artenspezifisch ist.

Eine weitere Aufgabe besteht darin, eine Diagnoseausstattung 20 (Diagnosekit) zur Verfügung zu stellen, die als ein Reagenz einen monoklonen Antimelanomantikörper enthält.

Eine weitere Aufgabe besteht darin, Diagnoseverfahren zum Auffinden von Melanomen bei Säugetieren, insbesondere Menschen, zur Verfügung zu stellen, bei denen ein nicht artenabhängiger monokloner Antimelanomantikörper verwendet 25 wird.

Andere vorzugsweise Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus der folgenden Beschreibung.

Erfindungsgemäß wird (1) ein Reagenz zur Verwendung 30 bei der Diagnose von Melanomen bei Menschen zur Verfügung gestellt, das einen monoklonen Antikörper enthält, der geeignet ist, ein Säugetieren eigenes Melanomantigen zu erken-

stellung durch Immunisierung mit Mausmelanom reagiert er nicht nur mit Mausmelanom sondern ebenso mit Melanomen von anderen Lebewesen wie menschlichen und Hamstermelanomen. Es wurde jedoch gefunden, daß der monoklonen Antikörper eine solche Spezifität aufweist, daß er in keinem Fall mit 5 Neuroblastom, Myelom, Fibrosarcom, schuppenförmigen Zellcarcinom, Akanthom, Zervikalcarcinom und Lymphom oder mit normalen Geweben (von der Haut, Augen, Cerebrum, usw.) von Menschen und Mäusen reagiert.

10 Die biochemische Analyse hat gezeigt, daß das menschliche oder Mäusemelanomantigen ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 31.000 ist. Insbesondere haben Experimente mit der Behandlung mit Exoglycosidase und Behandlung mit Tunicamycin zu der Entdeckung geführt, daß die 15 Antigenwirkung, die durch den monoklonen Antimelanomantikörper gemäß Vergleichsbeispiel (als "M2590 Antikörper" bezeichnet) erkannt wird, asparagingebundene Zuckerketten mit endständigen Speichelsäuren (sialic acid) ist.

20 Im allgemeinen erkennt ein monokloner Antikörper nur eine Antigendeterminante von Antigenmolekülen. Ist eine spezifizierte Antigendeterminante ein Protein, ist nur eine solche Determinante an einem Molekül vorhanden. Demnach kann nur ein Molekül des monoklonen Antikörpers mit einem 25 Antigenmolekül kombiniert werden. Jedoch erkennt der erfindungsgemäße monoklonen Antikörper ein Tumorantigen, das aus Zuckerketten zusammengesetzt ist. Das heißt, daß viele Zuckerketten an einem Antigenmolekül vorhanden sind, und daß deshalb viele Antikörpermoleküle mit einem Antigenmolekül kombinieren können. Entsprechend sollte der monoklonen Antikörper gemäß Erfindung mit seiner hochspezifischen Reaktivität hohe Sensitivität aufweisen, wenn er als 30 diagnostisches oder therapeutisches Mittel verwendet wird.

35 Da, wie zuvor erwähnt, der erfindungsgemäße monoklonen Antikörper, wie der M2590 Antikörper, gleichwertig mit nicht-menschlichen tierischen Melanomzellen und mensch-

Zentrifugenrohr eingegeben und 10 Minuten bei Zimmertemperatur und 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und der Rückstand in ein konstantes Temperaturbad bei 37°C eingebracht. Während die Zellen langsam mit der Spitze einer Pipette vermischt wurden, wurde 5 1 ml einer erhitzten 50 %igen Polyäthylenglycol(PEG) Lösung langsam über einen Zeitraum von 1 Minute zugegeben. Für eine weitere Minute wurde die Suspension mit der gleichen Pipette 10 gerührt. Dann wurden langsam 2 ml erhitzter RPMI-1640 unter Röhren über einen Zeitraum von 2 Minuten zugesetzt. Zusätzlich wurden über 2 bis 3 Minuten 7 ml RPMI-1640 zugegeben. 15 Die Mischung wurde bei Zimmertemperatur 10 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und 10 ml RPMI-1640 mit Gehalt an 10 % Kalbfetusserum versetzt. 20 Die Mischung wurde leicht gerührt. Die Zellsuspension wurde schrittweise in einer Menge von 0,1 ml je Ausnehmung auf eine flachbödige Mikrotestplatte mit 96 Ausnehmungen aufgegeben und in einem Kohlendioxidinkubator kultiviert.

(3) Untersuchungen

20 Am nächsten Tag nach Beginn der Kultivierung wurde 0,1 ml HAT (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin)-Kulturfluid zugesetzt; nach Ablauf von 2, 3, 5, 8 und 11 Tagen wurde eine Hälfte des Überstands in jeder Ausnehmung abgezogen und 25 0,1 ml frischen HAT-Kulturfluids zugesetzt. Dann wurde das Kulturmedium mit HT(Hypoxanthin, Thymidin)-Kulturfluid alle 3 oder 4 Tage ausgetauscht.

Als Zielzellen (target cells) wurden (1) B16 Mausmelanomzellen, 30 (2) menschliche Melanomzellen und (3) EL-4 Lymphomazellen von C57BL/6 Mäusen verwendet.  $5 \times 10^5$  der Zielzellen wurden mit 35 50 µl der überstehenden Kulturflüssigkeit des Hybridoma (einschließlich des Antikörpers) bei 0°C für 50 Minuten umgesetzt. Die Reaktion wurde auf einer Mikrotiterpoly-styrolplatte mit 96 Ausnehmungen (hergestellt von Dynatech Lab. Co.) durchgeführt. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugieren gewaschen und mit 50 µl Antimaus-Ig Antikörper

## (5) Reinigung des Antikörpers

1 x 10<sup>8</sup> Hybridomazellen wurden intraperitoneal jeder von (BALB/C x C57BL/6) F<sub>1</sub> Mäusen verabreicht; nach 10 Tagen wurde der Ascites, der den Antikörper enthielt, gesammelt.

5 10 ml Ascites wurden zentrifugiert, in ein Dialyserohr eingegeben und gegen 0,001M Phosphatpuffer (pH 6,5) für 48 Stunden dialysiert. Auf diese Weise konnten alle monoklonen Antikörper abgetrennt werden. Der abgetrennte monoklonen Antikörper wurde in einer geringen Menge von 3 %iger 10 NaCl-Lösung gelöst und gegen 0,1 M Phosphat/Natriumchloridpuffer (pH 7,2) dialysiert. Als Ergebnis konnten die meisten der anderen Proteine zusammen mit dem Überstand entfernt werden. Durch zwei- bis dreimaliges Wiederholen dieses Vorgangs wies der monoklonen Antikörper eine Reinheit 15 von mehr als 95 % auf. Die Immunoglobulinklassen der M2590 und M562 Antikörper war IgM; darüber hinaus waren es Eoglobuline.

Die Melanomantikörper, die wie zuvor beschrieben erhalten wurden, können als ein Melanomdiagnosemittel, beispielsweise in Form einer Lösung verwendet werden.

Das folgende Beispiel beschreibt eine Methode zum Diagnostizieren von Melanom unter Verwendung des erfundungsgemäßen Melanomdiagnosemittels.

25 Beispiel

## (1) Immuncassay in der Festphase

Es wurde eine Lösung von gereinigtem M2590 Antikörper (gereinigt durch isoelektrische Abscheidung) in einer Konzentration von 2 mg/ml hergestellt, wobei 0,1M Phosphat/Natriumsalzpuffer (pH 7,2) verwendet wurde. 60 µl der Antikörperlösung wurden je Ausnehmung auf eine 96 Ausnehmungen enthaltende Polystyrolplatte (hergestellt durch Dynatech Lab. Co.) in l-Form zugegeben und bei Zimmertemperatur über einen Zeitraum von einer Stunde umgesetzt. Dann wurde 35 0,5% Rinderserum Albumin (BSA) zugesetzt und die Platte drei-

Melanom-(B16)-Zellen oder menschlichen Melanomzellen (P-39) gemäß dem Verfahren, wie es in den letzten beiden Paragraphen des Abschnitts (1) zuvor beschrieben wurde, hergestellt. Die gebildeten Tumorzellenextrakte unterschiedlicher 5 Antigenkonzentrationen wurden zu dem in (1) beschriebenen Immunoassaysystem zugegeben und geprüft. Das Ergebnis, wie es in Fig. 2 abgebildet ist, ist derart, daß, wenn ein Extrakt entsprechend  $10^6$ /ml Tumorzellen schrittweise auf ein Verhältnis von 1:10 verdünnt wurde, die Auffindung 10 bei einer Konzentration von  $10^5$ /ml und mehr nahezu linear abfiel, wobei das Minimum zur Auffindung  $10^3$ - $10^2$ /ml 15 betrug.

Diese experimentellen Ergebnisse zeigen, daß der Immunoassay in Festphase unter Verwendung dieses Antikörpers (M2590) sehr genau ist und die Auffindung sehr geringer Mengen an Melanomantigen ermöglicht.

(3) Spezifität des Immunoassays in der Festphase  
Um die Spezifität der Festphasenimmunoassay-Methode zu prüfen, wurden Tumorantigenextrakte gemäß (1) aus drei Arten 20 von menschlichen Melanomzellen (P-36, P-39, P-22), Hamstermelanomzellen, zwei Arten von Mausmelanomzellen (B-16, S-91) menschlichen Cervicalcarcinom (Hela), chirurgisch resezierten Fragmenten von einem Melanompatienten (menschlich, zwei Fälle), menschlicher Hautkrebs (schuppenförmiges Zellcarcinom) und resezierte Proben von Basalioma hergestellt. 25 Diese Tumorantigenextrakte wurden dem Immunoassay in Festphase gemäß Abschnitt (1) unterworfen. Das Ergebnis gemäß Fig. 3 bestand darin, daß Extrakte von Melanomzellen, die von Menschen, Hamstern und Mäusen erhalten wurden, unab- 30 hängig davon, ob sie kultivierte Zellstränge oder chirurgisch resezierte Proben waren, durch Immunoassay aufgezeigt wurden; der Antikörper jedoch reagierte überhaupt nicht mit anderen Krebszellen als Melanomzellen, wie menschlichen Cervicalcarcinom, schuppenförmigen Zellkarzinom und Acanthoma. 35 Die Ergebnisse werden in Fig. 3 wiedergegeben.



Fig. 3

Tumorextrakt	Radioaktivität (cpm)		
	IC	ICC	( $\times 10^2$ )
Kultivierte Zellstränge			
Melanom P36			
Melanom P39			
Melanom P22			
Karzinom Hela			
Chirurgisch resezierte Probe			
Melanom MS			
Melanom TS			
schuppenförmiges Zellkarzinom TS			
Basaliom NY			